Cryptogamie, Mycol. 1990, 11 (1): 31-46

ORGANISATION INFRASTRUCTURALE DU MYCELIUM ET DES PROTOPLASTES DE *NECTRIA HAEMATOCOCCA* (BERK. ET BER.) WR. APRES TRAITEMENT PAR LA CYTOHELICASE

J. ORCIVAL et F. LAHBIL

Laboratoire de Cryptogamie, Université Paris-Sud,
91405 Orsay, France.

RÉSUMÉ - Les hyphes de *Nectria haematococca* traités par la cytohélicase en vue de l'obtention de protoplastes présentent, après 3h de traitement, des remaniements importants au niveau du noyau et des organites cytoplasmiques. Les protoplastes obtenus montrent au cours de leur évolution des empilements de vésicules membranaires formées à partir de la membrane nucléaire; ces empilements sont assimilables aux lamelles annelées décrites dans divers matériels tels que les oocytes et certains tissus glandulaires animaux et dans le pollen de quelques plantes. Le rôle de ces structures est discuté.

ABSTRACT - *Nectria haematococca* hyphae, treated by cytohelicase for protoplast obtention, show, after 3h of treatment, important cell modification in the nucleus and in cytoplasmic organelles. The protoplasts show during their evolution, membrane vesicles stacks which may be assimilated to annulate lamellae described in various organisms. The function of these structures is discussed.

MOTS CLÉS : Ascomycètes, infrastructure, lamelles annelées, noyau, protoplastes.

Les protoplastes de champignons filamenteux sont des outils de plus en plus utilisés pour l'étude de nombreux problèmes: formation de la paroi, régénération génétique, transformation. Dans notre laboratoire, nous nous en servons pour l'étude du déterminisme de la différenciation chez *Nectria haematococca* (Daboussi, 1985). Des études préalables sur les divers facteurs influant sur le rendement optimal (Lahbil, 1984) nous ont amenés à effectuer une étude ultrastructurale du mycélium, soumis à l'action de la cytohélicase et des protoplastes à divers stades de leur évolution. Il existe actuellement plusieurs travaux sur l'infrastructure des protoplastes de champignons filamenteux (Gibson & Peberdy, 1972; Isaac & al., 1979; Tanaka &

al., 1981), mais peu d'observations concernent la structure des hyphes traités par les enzymes pectolytiques dans le milieu d'incubation. Manocha (1968) a présenté quelques images de conidies de *Neurospora crassa* traitées de 3 à 4 heures par une solution d'enzyme d'escargot, dans lesquelles on peut observer des modifications de structure du noyau. Nos observations recoupent celles des auteurs précités, et nous permettent d'apporter des précisions sur l'origine et le rôle d'infrastructures cytoplasmiques lamellaires.

MATERIEL ET METHODES

Organisme: *Nectria haematococca* (Berk. et Br.) Wr., souche sauvage S1, est fourni par le Centraal bureau Voor Schimmerlculture de Baarn (Netherlands).

Culture et obtention de protoplastes: Ces méthodes ont été décrites dans un précèdent travail (Lahbil, 1984); nous les rappelons brièvement: du mycélium provenant d'une culture âgée de 20h est préincubé dans une solution de mercaptoéthanol (0,1%) dans KCl 0,6M pH 5,8. Après 4 rinçages dans la solution de KCl 0,6M, le mycélium est resuspendu dans cette même solution contenant la préparation enzymatique (cytohélicase lyophilisée IBF 2 mg/ml, 5 ml de milieu d'incubation pour 0,1g de mycélium). L'incubation dure de 1 à 4 heures.

Techniques de microscopie électronique: Le matériel, traité ou non par la cytohélicase, est fixé pendant 3h dans une solution de glutaraldéhyde à 4% en tampon phosphate 0,1M pH 6,9 additionné de KCl 0,6M. Après 2 rinçages dans le même tampon, le matériel est ensuite post-fixé pendant 18 h dans une solution de tétroxyde d'osmium à 2% et est ensuite pré-inclus dans la fibrine suivant la méthode de Charret & Faure-Fremiet (1967), déshydraté et inclus dans l'Epon. Les coupes fines sont contrastées par l'acétate d'uranyle à 2% pendant 30 mn et par le citrate de Plomb pendant 10 mn.

Pour la détection de polyholosides liés en C1-C4, nous avons utilisé le test Patag d'après Thiery (1967).

RESULTATS

Ultrastructure des hyphes non traités par l'enzyme

Les hyphes âgés de 24h présentent en coupe transversale des caractéristiques suivantes:

- la paroi est d'épaisseur régulière de l'ordre de 90 nm, elle apparaît claire après coloration uranyle-plomb (Fig. 1, 2); le test Patag révèle une structure fibrillaire traduisant la présence de β 1-4 glucanes, essentiellement

de la chitine (Fig. 3); les polyholosides liés en C1-C3 ne sont pas révélés par ce test,

- le cytoplasme a une structure comparable à celle que l'on rencontre généralement chez les ascomycètes; très dense, il contient la plupart des organites habituels: noyau d'aspect homogène, ribosomes, mitochondries (Fig. 2, 3); les amas de glycogène sont abondants (Fig. 1); les vacuoles sont inexistantes. A partir de 24h, les hyphes se remplissent de grosses inclusions lipidiques, qui sont les marqueurs de cellules distales; les organites cellulaires se raréfient, et on peut observer quelques rares vacuoles.

Ultrastructure des hyphes au cours de la digestion enzymatique

On n'observe pas de différence significative entre la structure des hyphes traités durant 1h dans la solution d'enzymes et celle des hyphes non traités. Bien que des protoplastes soient libérés à partir de 30 mn d'incubation (Lahbil, 1984), le nombre d'hyphes sur lequel l'hydrolyse enzymatique produit un effet visible doit être très faible dans les culots fixés.

Par contre, l'observation des culots d'hyphes traités pendant 3h montre:

- des sections d'hyphes dont la paroi n'a pas été (ou peu) attaquée par les enzymes; les structures sont identiques à celles des témoins,

- des structures membranaires diverses, essentiellement des vésicules émises par le plasmalemme au cours de l'extrusion du protoplaste, ou formées secondairement ("subprotoplaste"),

- des sections de protoplastes totalement démunis de parois,

- des sections d'hyphes dont la paroi est plus ou moins digérée (Fig. 4, 5, 6, 7, 8). L'aspect de la paroi de ces hyphes est variable; il peut être identique à celui des hyphes témoins (Fig. 4, flèche) ou moins bien délimité (Fig. 5, 6), pouvant à la limite se présenter comme un résidu fibrillaire diffus (Fig. 8, flèche). Le test Patag révèle une couche externe fortement positive, contenant des granules de 37 nm de diamètre environ, d'épaisseur irrégulière et parfois interrompue par des pores (Fig. 7, flèches). La cytohélicase hydrolysant les glucanes liés en 1-3, cette couche est essentiellement constituée de chitine.

Le cytoplasme montre des différences importantes par rapport à celui des hyphes témoins; il apparaît plus clair, sans doute à cause d'une forte hydratation et contient des vacuoles caractéristiques (Fig. 4, 7, 8). Le glycogène a totalement disparu et ne peut être révélé par le test Patag. Quelques inclusions lipidiques peuvent être observées. Les mitochondries sont parfois dilatées (Fig. 8).

Le noyau présente les modifications les plus remarquables: on peut observer parfois un réarrangement du matériel intranucléaire, qui est plus condensé en périphérie qu'au centre, où il peut apparaître sous forme d'un

réseau fibrillaire lâche; ceci se traduit par une différence d'aspect ténue (Fig. 5, flèches) ou marquée (Fig. 6); on observe également des dilatations localisées ou généralisées de l'enveloppe nucléaire (Fig. 6, 8, têtes de flèches).

Ultrastructure des protoplastes obtenus

Les protoplastes nucléés ont, soit un cytoplasme dont l'organisation est compatible avec une viabilité, soit un cytoplasme fibreux, dépourvu de ribosomes et par conséquent non viable.

La première catégorie est représentée dans les figures 9, 10. Le plasmalemme est plus ou moins ondulé; on peut parfois observer quelques extrusions (Fig. 10, flèche). Les ribosomes sont abondants.

Les mitochondries sont assez nombreuses, avec des crêtes parallèles et une matrix dense (Fig. 9), ou bien avec des crêtes dilatées et une matrix claire (Fig. 10). On observe des inclusions lipidiques denses, et plus rarement de petits amas de glycogène clairs (Fig. 9) dont la nature a pu être vérifiée par le test Patag. Les vacuoles sont généralement présentes et leur taille est variable; elles contiennent parfois des précipités denses constitués de polyphosphates (donnant une coloration métachromatique avec le bleu de toluidine); certaines sections sont dépourvues de vacuoles, le protoplaste n'en contenant pas, ou le plan de coupe ne passant pas à leur niveau.

Nous avons parfois observé des structures assimilables aux appareils de Golgi (Fig. 11), tels qu'ils ont été décrits dans le mycélium de divers champignons filamenteux (Dargent & al., 1982; Newhouse & al., 1983).

Une des caractéristiques les plus remarquables des protoplastes est la présence dans le cytoplasme de cisternes de reticulum lisse; ces cisternes peuvent être aplaties (Fig. 9), dilatées, ou alternativement aplaties et dilatées (Fig. 13, 14, 15); souvent, on peut en observer des empilements importants, jusqu'à une dizaine (Fig. 13); elles peuvent se situer au sein du cytoplasme ou en position périphérique, à proximité du plasmalemme (Fig. 9, flèches, Fig. 11). Ces structures se forment à partir de l'enveloppe nucléaire; celle-ci se dilate localement (Fig. 15, 16, 17), forme des extrusions qui s'isolent dans le cytoplasme sous forme de vésicules qui s'aplatissent latéralement et fusionnent entre elles (Fig. 15, 16).

L'organisation interne du noyau ne présente aucune caractéristique particulière (Fig. 9, 10, 17). Nous n'avons pas retrouvé les ségrégations de matériels vues dans les hyphes en voie de digestion dans la cytohélicase, et décrites dans des protoplastes d'*Aspergillus niger* libérés au bout d'1h (Gibson & Peberdy, 1972). Nous avons parfois observé 2 profils de noyau par coupe provenant de protoplastes plurinucléés.

Le test Patag appliqué aux coupes de protoplastes ne permet pas de détecter l'accumulation de polyholosides liés en C1-C4 à l'intérieur des cisternes; le contraste modéré des membranes est comparable à celui des au-

tres organites; seules quelques petites vésicules contiennent un précipité dense (Fig. 12, flèche).

DISCUSSION

Le passage de cellules hyphales à l'état de protoplastes entraîne des perturbations physiologiques partiellement visualisées par des modifications d'infrastructure. Certaines de ces modifications sont précoces et apparaissent alors que la paroi n'est pas encore totalement désorganisée: il s'agit de l'apparition des vacuoles, du gonflement des mitochondries et de l'enveloppe nucléaire, résultant de l'entrée d'un flux d'eau dans la cellule; la modification de l'organisation nucléaire interne signalée par Manocha (1968) dans des conidies de *Neurospora* en cours de digestion, Gibson & Peberdy (1972) dans des protoplastes d' *Aspergillus* formés précocement et nous-mêmes dans des hyphes de *Nectria* en cours de digestion, ne trouve pas une explication immédiate; s'il ne s'agit pas d'un artefact, on peut y voir une réorganisation "d'urgence" du fonctionnement nucléaire face à des conditions extérieures drastiques, avec modification des priorités au niveau de la transcription; cette hypothèse s'appuie en partie sur le fait que les ribosomes sont abondants dans le cytoplasme des protoplastes, mais nécessiterait une étude plus approfondie à l'aide d'études cytochimiques des acides nucléiques.

La présence de reticulum est générale dans les protoplastes de champignons filamenteux; Gibson & Peberdy (1972) observent du reticulum granuleux dans des protoplastes d' *Aspergillus*; des images de cisternes empilées ont été publiées par Manocha (1968) dans des protoplastes de *Neurospora*, par Isaac & al. (1979) dans des protoplastes d' *Aspergillus*, et par Tanaka & al. (1981) dans des protoplastes de *Pyricularia oryzae*; ces derniers auteurs assimilent ces structures des appareils de Golgi intervenant dans la régénération de la paroi; cette interprétation ne peut être retenue: les appareils de Golgi identifiés chez les Septomycètes ont une morphologie très différente; des études ont été faites à ce sujet par Dargent & al. (1982) chez *Hypomyces chlorinus* et par Newhouse & al. (1983) chez *Endothia parasitica*; dans les protoplastes de *Nectria*, nous avons observé quelques structures pouvant être assimilées aux organites décrits par ces auteurs, et très différentes des empilements lamellaires.

Nous avons vu que, chez *Nectria haematococca*, les empilements de cisternes dans les protoplastes proviennent d'un bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire; ce type de structure est comparable aux lamelles annelées décrites dans diverses cellules animales reproductrices ou néoplasiques, et dans des grains de pollen (voir les revues de Wischnitzer (1970) et de Kessel (1983)). Les fonctions attribuées à ces structures sont variées: transport de matériel nucléaire dans le cytoplasme, genèse de reticulum, fixation de polysomes; il n'y a encore aucune évidence pour qu'une ou plusieurs de ces

fonctions puissent être attribuées à ces structures dans les protoplastes de *Nectria*.

Des bourgeonnements de l'enveloppe nucléaire ont été décrits chez divers Ascomycètes, en particulier par Carrol (1967), Wells (1972) et Beckett (1981); les vésicules issues de ces bourgeonnements participent à la formation de la membrane délimitant l'ascospore. Dans les protoplastes de *Nectria*, des cisternes issues de la membrane nucléaire bordent le plasmalemme et peuvent avoir un rôle voisin des bourgeonnements nucléaires des noyaux de l'asque qui participent à la formation du plasmalemme de l'ascospore.

L'organisation de protoplastes naturels, tels que les zoospores de *Pythium* (Groves & Bracker, 1978) et de *Phytophthora* (Bartnicki-Garcia & Hemmes, 1976), nous apporte des informations utiles: dans le cytoplasme de ces cellules, on observe divers types de vésicules périphériques: les unes contiennent des glycoprotéines participant à l'adhésion de la spore, d'autres interviennent dans l'expulsion de l'eau: leur membrane se fusionne avec le plasmalemme et le renouvelle (Pinto da Silva & Nogueira, 1977); des cisternes aplaties bordent la face interne du plasmalemme, sans qu'il y ait évidence d'une fusion éventuelle avec ce dernier; ce type de cellule, provisoirement dépourvu de parois, met en place des structures adaptées à un passage aquatique. Les protoplastes "artificiels", obtenus par digestion des parois des hyphes, réorganisent leur cytoplasme en développant des systèmes membranaires comparables, bien que moins spécialisés; d'autre part, l'hétérogénéité des hyphes (répartition des organites, nature et quantité des réserves nutritives, composition du plasmalemme) explique en partie la variabilité des structures observées dans les protoplastes de *Nectria* et le fait qu'une partie seulement d'entre eux peut régénérer. Cette réorganisation cytoplasmique, caractérisée par une synthèse importante de membranes, mobilise les réserves préexistantes dans les hyphes, glycogène et lipides, et s'accompagne d'une activité mitochondriale importante.

En conclusion, nous proposons un schéma interprétatif de la transformation de la cellule hyphale en protoplaste chez *Nectria haematococca* (Fig. 18).

BIBLIOGRAPHIE

BARTNICKI-GARCIA S. and HEMMES D.E., 1976 - Some aspects of the form and function of oomycetes spores. *In*: W.M. HESS & D.J.WEBER, *The fungal spore. Form and Function.* New-York, John Wiley and Sons: 593-641.

BECKETT A., 1981 - Ascospores formation. *In:* G.TURIAN & H.R. HOHL, *The fungal spore: Morphogenetic controls.* Academic Press, London, New-York, San Francisco: 108-129.

CARROL G.C., 1967 - The ultrastructure of ascospore delimitation in *Saccobolus kerverni*. *J. Cell Biol.* 33: 218-224.

CHARRET R. et FAURE-FREMIET E., 1967 - Technique de rassemblement de microorganismes. Préinclusion dans un caillot de fibrine. *J. Microscop.* 6: 1063-1066.

DABOUSSI M.J., 1985 - Loss of a cytoplasmic factor through ethidium bromide and elevated temperature treatments in *Nectria haematococca. Canad. J. Bot.* 31: 104-108.

DARGENT R., TOUZET-SOULET J.M., RAMI J. and MONTANT C., 1982 - Cytochemical caracterization of Golgi apparatus in some filamentous fungi. *Exp. Mycol.* 6: 101-114.

GIBSON R.K. and PEBERDY J.F., 1972 - Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol.* 72: 529-538.

GROVES N. and BRACKER C.E., 1978 - Protoplasmic changes during zoospore encystement and germination in *Pythium aphanidermatum. Exp. Mycol.* 2: 51-97.

ISAAC S., BRIARTY L.G. and PEBERDY J.F., 1979 - The stereology of protoplasts from *Aspergillus nidulans. In*: L. FERENCZY & G.L. FARKAS, *Advances in Protoplasts Research.* Budapest, Akadémiai Kiado, Oxford, Pergamon Press: 213-219.

KESSEL R.G., 1983 - The structure and function of annulate lamellae: Porous cytoplasmic and intranuclear membranes. *Int. Rev. Cytol.* 82: 181-303.

LAHBIL F., 1984 - Les protoplastes de *Nectria haematococca* (Berk. et Br.) Wr.: obtention, régénération de mycélium et fusion. Thèse de 3ème Cycle, Paris-Sud, Orsay.

MANOCHA M.S., 1968 - Electron microscopy of the conidial protoplast of *Neurospora crassa. Canad. J. Bot.* 46: 1561-1564.

NEWHOUSE J.R., HOCH H.C. and MACDONALD W.L., 1983 - The ultrastructure of *Endothia parasitica* comparison of ■ virulent with ■ hypovirulent isolate. *Canad. J. Bot.* 61: 389-399.

PINTO DA SILVA P. and NOGUEIRA M.L., 1977 - Membrane fusion during of *Phytophthora palmivora* zoospores during encystment. *J. Cell Biol.* 78: 161-181.

TANAKA H., OGASAWARA N. and KAMINIYA S., 1981 - Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P2: Preparation and regeneration into hyphal form. *Agric. Biol. Chem.* 45: 1541-1552.

THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6: 987-1018.

WELLS K., 1972 - Light and electron microscopic studies of *Ascobolus stercoriarius.* II. Ascus and Ascorpore Ontogeny. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 62: 1-33.

WISCHNITZER S., 1970 - The annulate lamellae. *Int. Rev. Cytol.* 27: 65-100.

EXPLICATION DES FIGURES

Echelle: 0,5μm.

Figure 1: Coupes d'hyphes d'une culture de 24h. Les sections les plus jeunes sont riches en glycogène. Les sections plus âgées (à droite) contiennent des inclusions lipidiques (en noir). g = glycogène, l = inclusion lipidique.

Figure 2: Section transversale d'hyphe. Le noyau (N) a une structure homogène, la paroi est peu contrastée.

Figure 3: Coupe d'hyphe témoin traité par le test Patag; le glycogène est contrasté en noir, la structure fibrillaire de la paroi est mise en évidence. (N = noyau, m = mitochondrie).

Figure 4: Vue d'ensemble d'hyphes traités par la cytohélicase pendant 3h. Le glycogène a disparu; on observe des vacuoles (V). L'aspect des parois est variable. La flèche indique une paroi comparable à celle de la Fig. 2.

Figure 5: Coupe d'hyphe traité par la cytohélicase; la paroi apparaît légèrement digérée (tête de flèche): on observe une légère ségrégation du matériel nucléaire (flèches).

Figure 6: Même traitement: la digestion de la paroi est plus avancée; l'enveloppe nucléaire est dilatée, et on observe une ségrégation spectaculaire entre un matériel nucléaire fibreux central et un matériel granulaire périphérique.

Figure 7: Test Patag: il ne reste de la paroi qu'une couche granulaire fortement positive et percée par endroits (flèches).

Figure 8: Coupe traitée par la cytohélicase; l'enveloppe nucléaire est dilatée par endroits; le cytoplasme contient des vacuoles (V) (m = mitochondries).

Figure 9: Vue générale d'un protoplaste de *Nectria haematococca*: on observe un noyau (N), une vacuole remplie de matériel dense (V), des mitochondries à matrix dense et crêtes développées (m), des cisternes de reticulum dont certaines bordent le plasmalemme (flèches).

Figure 10: Autre type de protoplastes; les mitochondries ont une matrix claire et des crêtes peu développées (flèche); le plasmalemme est sinueux avec quelques extrusions (flèche).

Figure 11: Empilement de cisternes de reticulum lisse; l'organite indiqué par des flèches est peut-être un appareil de Golgi.

Figure 12: Cisternes dilatées contre la face interne du plasmalemme; la coupe a été traitée par la méthode Patag; seule une vésicule présente une légère réaction positive (flèche).

Figure 13: Empilements de cisternes dans le cytoplasme; ce type de structure est assimilable aux lamelles annelées.

Figure 14: Autre aspect des empilements; les cisternes sont périodiquement dilatées et aplaties à droite. aggloméral de débris membranaires.

Figure 15: Formation des cisternes; la membrane nucléaire externe présente une série de dilations (flèches) dont l'aspect est comparable aux cisternes dilatées du cytoplasme.

Figure 16: Détail de 2 bourgeonnements de la membrane nucléaire externe.

Figure 17: L'enveloppe nucléaire montre des régions aplaties, d'autres dilatées (flèches), précédent la formation d'une nouvelle travée de cisternes. (nu = nucléole; v = vacuole).

Figure 18: Représentation schématique de la transformation d'un hyphe en protoplaste chez *Nectria haematococca:* L'hyphe (1) perd sa paroi (2) et le protoplaste se réorganise (3,4).

EXPLANTATION OF THE PLATES

Scales: 0,5μm.

Figure 1: Hyphae section from a 24h culture. Youngest hyphae are rich in glycogen. Older hyphae (on the right) countain lipid inclusions (in black) g = glycogen, L = lipid inclusions.

Figure 2: Hyphae transversal section. Nucleus (N) has an homogeneous structure, wall is not very contrasted.

Figure 3: Hyphae section after Patag test; glycogen is black, fibrillar structure of the wall appears. (N = nucleus, m = mitochondria).

Figure 4: Global view of 3h cytohelicase treated hyphae. Glycogen has desappeared. Some vacuoles are observed (V). Walls appearance varies. Arrow shows a wall comparable with the on of Fig.2.

Figure 5: Cytohelicase treated hyphae: Wall is slightly digested (arrow head); a slight segregation in nuclear material may be observed (arrows).

Figure 6: Same treatment. Wall digestion is more advanced. Nuclear cover is dilated, and dramatic segregation is seen between a fibrous central nuclear material and a granular peripheric material.

Figure 7: Patag test: a strongly positive granular layer, with holes (arrows) is the rest of the wall.

Figure 8: Cytohelicase treatment: nuclear cover is dilated in places; the cytoplasm countains vacuoles (V). (m = mitochondrion).

Figure 9: General view of a protoplast of *Nectria haematococca*: it is observed a nucleus (N), a vacuole with dense material (V), mitochondria with dense matrix and developed cristae (m), reticulum cisternae of which some are along the plasmalemme (arrows).

Figure 10: Other type of protoplast; mitochondria have clear matrix and little cristae (arrow); plasmalemme is sinuous with some extrusions (arrow).

Figure 11: Stacks of smooth reticulum vesicules; structure pointed out by arrow is perhaps a Golgi apparatus.

Figure 12: Dilated vesicles along plasmalemme inner face; the section is treated by Patag method; a single vesicle (arrow) shows a slight positive reaction.

Figure 13: Cisternae stacks in the cytoplasm; this structure may be assimilated to annulate lamellae.

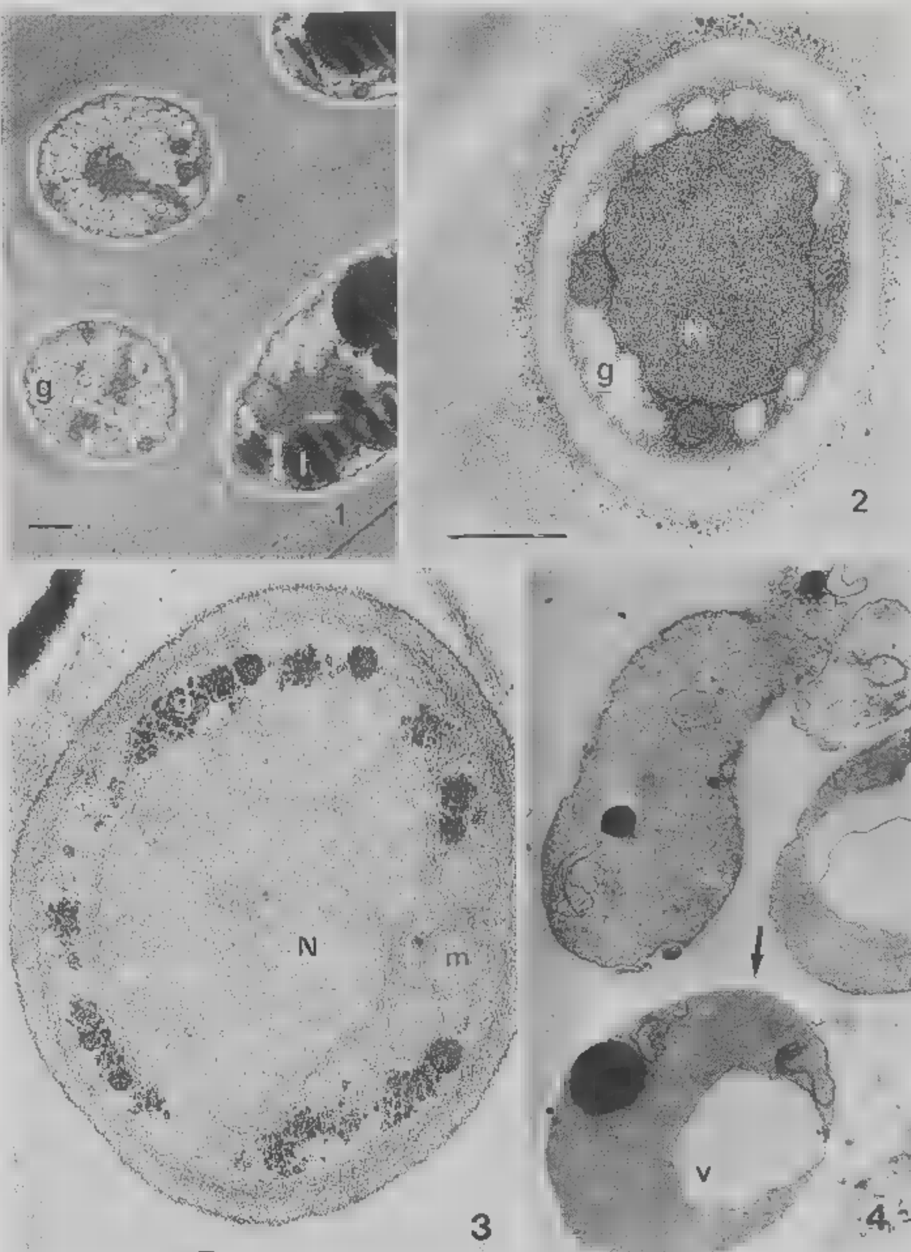
Figure 14: Other appearance of stacks; the cisternae are periodically dilated and flattened; on the right, agglomerate of membrane fragments.

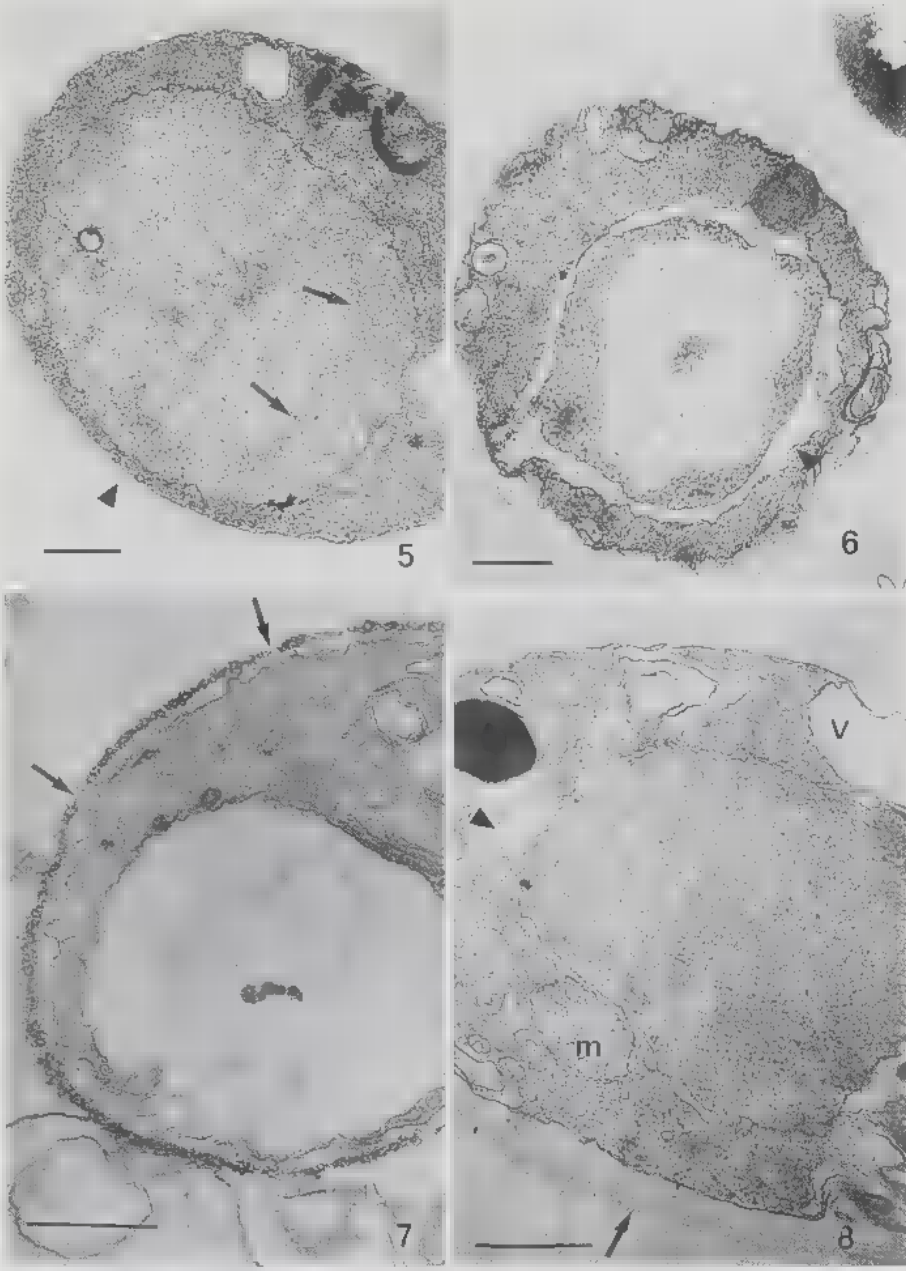
Figure 15: Cisternae formation; outer nuclear membrane shows serial dilatations (arrows) whose appearance is comparable to dilated cisternae in the cytoplasm.

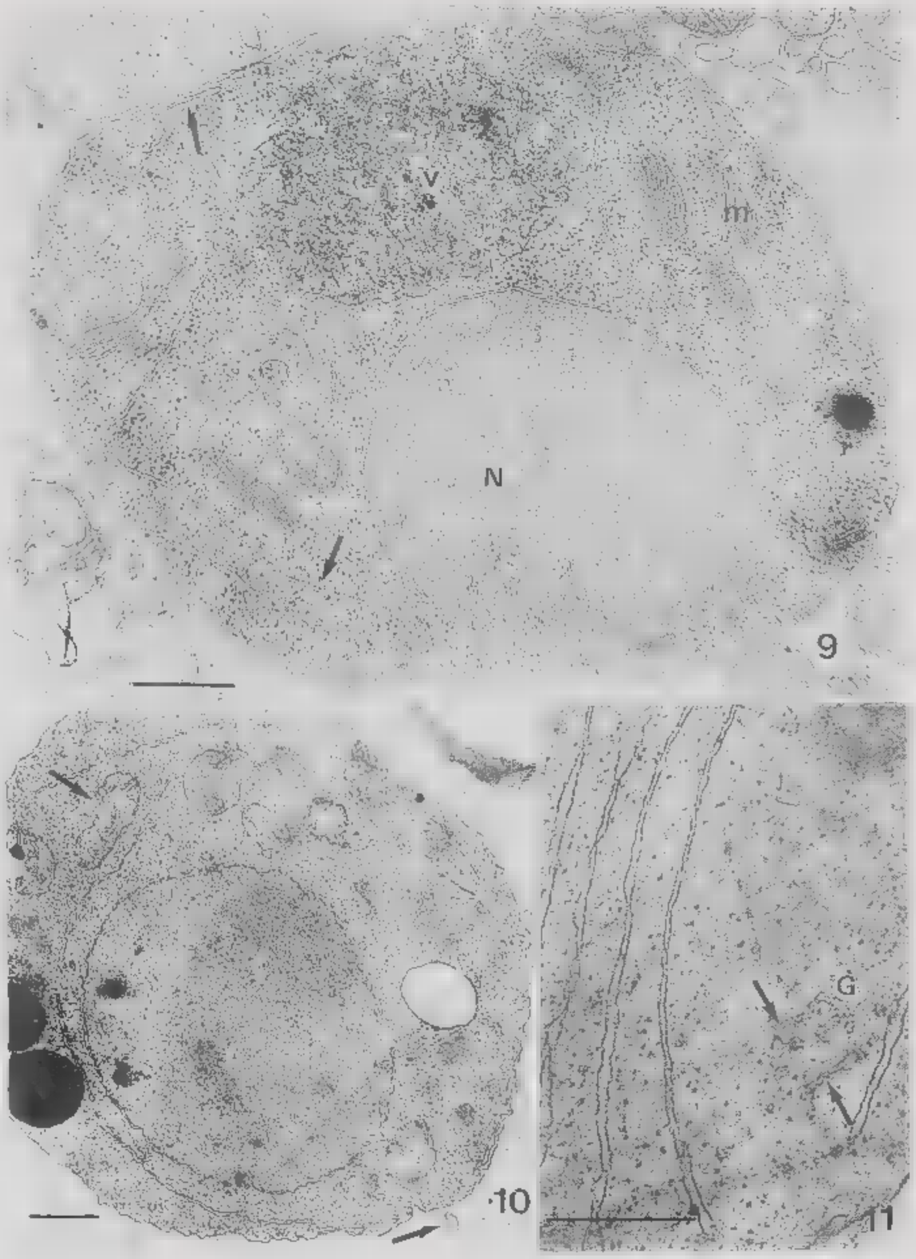
Figure 16: Detail of two blebs of outer nuclear membrane.

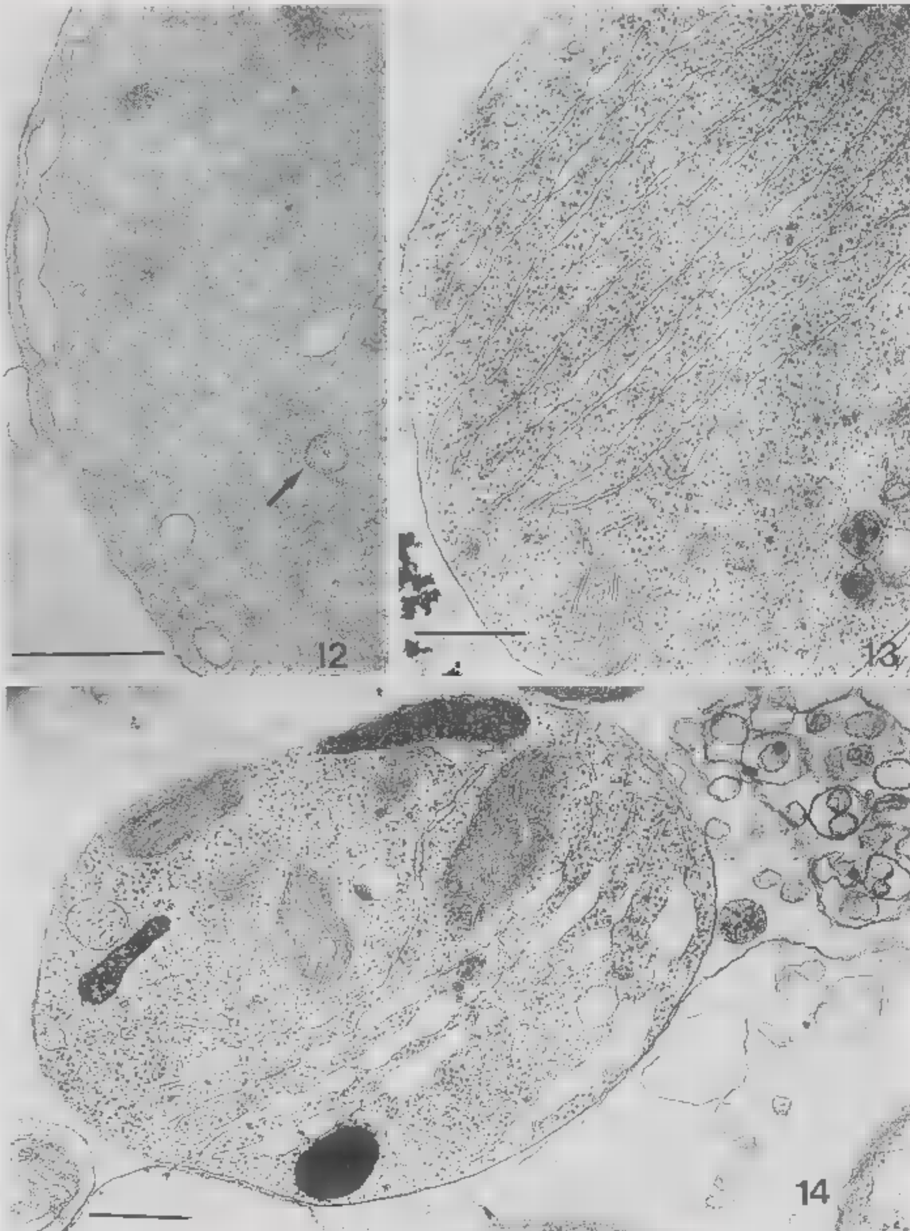
Figure 17: Nuclear cover shows flattened zones, other are dilated, before the formation of a new row of cisternae.

Figure 18: Schematic representation of hyphae into protoplast transformation in *Nectria haematococca:* The hyphae (1) loss his wall (2) and the protoplast is reorganized (3, 4).


g
t
1
g
2
N
m
3
v
4


5
6
7
V
m
8


V
m
N
9
G
10
11


12
13
14

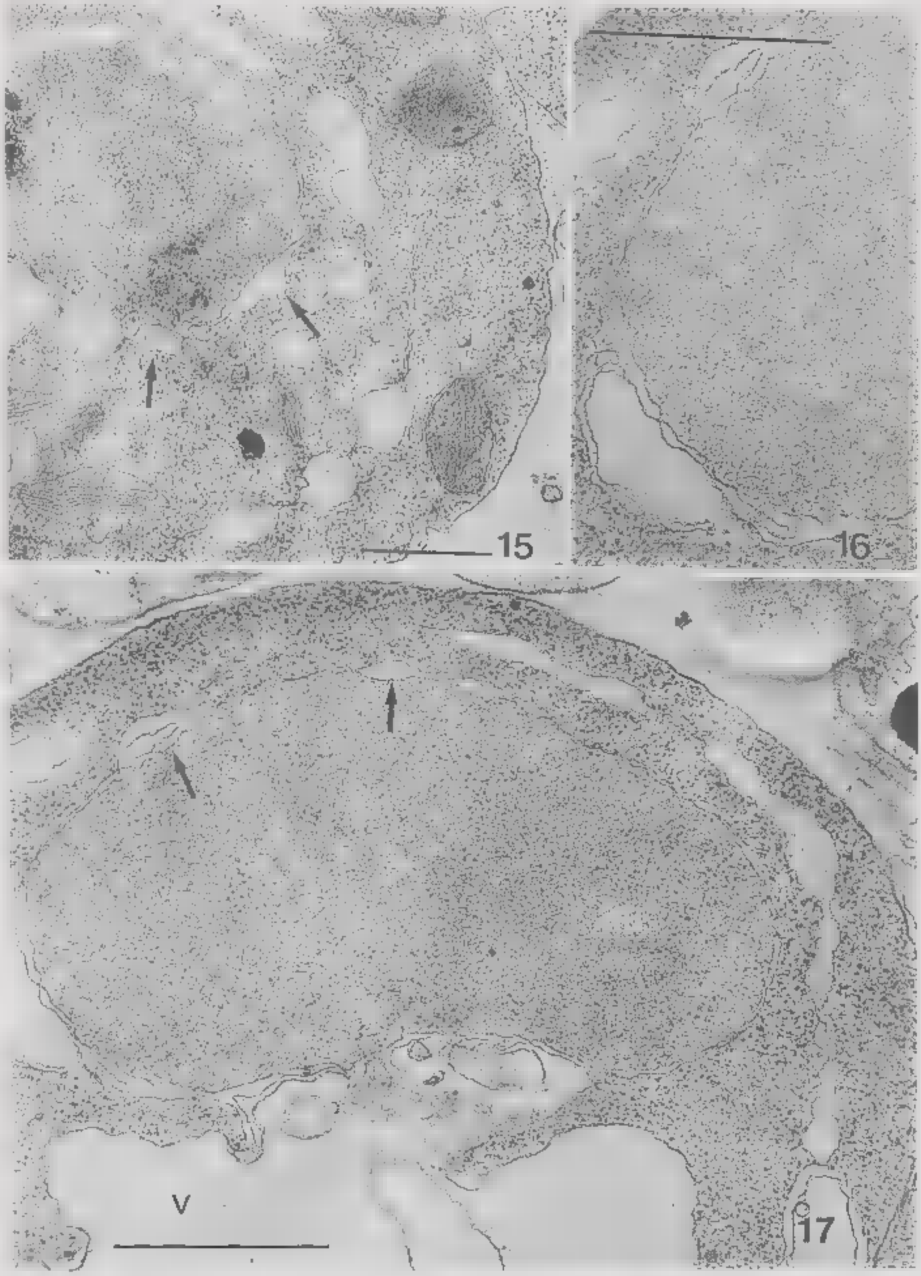

15
16
V
17

Figure 18

